

# Részletes zárójelentés a “Poszttranszlációs módosítások hatása a humán szívizom kontraktilitására” című, az OTKA rendszerben F 48873 számon nyilvántartott pályázatról.

A protein kináz C miokardiális kontraktilitásban betöltött szerepének vizsgálata (Molnár és munkatársai, Journal of Biological Chemistry, 2009 alapján) ..... 2

1. A pályázatban megfogalmazott célok érdekében alkalmazott módszerek leírása .....	2
1.1. Immunhisztokémia: a protein kináz C (PKC) és troponin I (TnI) kimutatása.....	2
1.2. Biokémiai módszerek.....	2
1.3. Mechanikai mérések izolált szívizomsejteken.....	5
1.4. Statisztikai módszerek .....	9
2. Eredmények .....	9
2.1. Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívizom sejtek kalcium aktiválta kontraktilis erejére.....	9
2.2. Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívizom sejtek passzív feszülésére .....	12
2.3. Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívizom sejtek kalcium érzékenységre .....	13
2.4. PKC izoenzim expressziója humán kardiomyocytákban .....	14
2.5. PKC in vitro foszforiláció.....	14
2.6. PKC $\alpha$ intracelluláris target fehérjéinek kimutatása .....	15
2.7. Ca-függő cTnI és PKC $\alpha$ interakció .....	16
2.8. PKC $\alpha$ és cTnI együttes előfordulásának (kolokalizáció) kimutatása humán kamrai izomzatban .....	17
3. Megbeszélés.....	17

A miokardiális fehérje oxidáció hatásai és a folyamat reverzibilitása..... 19

1. A poli-ADP-ribosiláció fokozódása szívelégtelenségben (Molnár és munkatársai, Molecular Medicine, 2006 alapján).....	19
2. A miofibrilláris fehérjék oxidációja a kontraktilis erő csökkenéséhez vezet humán miokardiumban (Hertelendi és munkatársai, Antioxidants and Redox Signaling, 2008 alapján) .....	19
3. Az ischaemia-reperfúzió során megemelkedő peroxinitrit kontrakció csökkentő hatásainak feltárása humán miokardiumban (Hertelendi és munkatársai, Journal of Cellular and Molecular Medicine, in press alapján).....	20
4. A tartós PKC overexpresszió szívelégtelenséghez vezető mechanizmusának vizsgálata (Édes és munkatársai, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2008 alapján).....	20

A vanilloid receptor aktivációjának vaszkuláris hatásai..... 21

1. Az ischaemia során bekövetkező pH csökkenés hatására aktiválódó TRPV1 vaszkuláris hatásainak vizsgálata (Kark és munkatársai, Molecular Pharmacology, 2008 alapján).....	21
2. A vaszkuláris TRPV1 fiziológiai regulációjának vizsgálata (Lizanecz és munkatársai, Molecular Pharmacology, 2006 alapján).....	21

Irodalomjegyzék .....

# **A protein kináz C miokardiális kontraktilitásban betöltött szerepének vizsgálata (Molnár és munkatársai, Journal of Biological Chemistry, 2009 alapján)**

## ***1. A pályázatban megfogalmazott célok érdekében alkalmazott módszerek leírása***

### **1.1. Immunhisztokémia: a protein kináz C (PKC) és troponin I (TnI) kimutatása**

Humán szívizom mintákból -20°C-on kryostatban készítettünk 10 µm-es metszeteket, melyeket 5 percre jéghideg acetona helyezve fixáltunk. A fixált metszeteket PBS-ben mostuk szobahőmérsékleten, majd 1 órán át kecske szérumban albumint tartalmazó blokkoló oldatban blokkoltuk. A metszeteket PKCα ellenes nyúlban termeltetett elsődleges antitesttel (1:100, Sigma-Aldrich) majd FITC-konjugált kecskében termeltetett nyúl ellenes antitesttel (1:100, Vector Laboratories Inc.) inkubáltuk. A TnI vizualizálására TnI ellenes egérben termeltetett elsődleges antitesttel (clone 22B11, 1:100, Research Diagnostics Inc.) inkubáltuk a metszeteket, végül egy háromlépéses sztreptavidin-biotin komplex alapú (1:100, Jackson Laboratories) immunhisztokémiai eljárás segítségével festettük meg.

### **1.2. Biokémiai módszerek**

A vizsgált kontraktilis változások biokémiai hátterének tisztázásához többféle módszert alkalmaztunk. A myofibrilláris fehérjék in vitro foszforilációjával és Western blot analízisével az egyes fehérjék szintjén bekövetkező változásokat detektáltuk. A mechanikai és biokémiai méréseinkből származó adatok megbízható összevethetősége érdekében hasonló kísérleti körülmények (hőmérséklet, inkubációk időtartama) megteremtésére törekedtünk a különböző módszerek alkalmazása során. A mechanikai és biokémiai kísérleteinkben ugyanolyan módon előállított izolált, permeabilizált szívizomsejteket tartalmazó homogenizátumot használtuk.

### 1.2.1. Humán szívizomsejtek „rekonstrukciója”

Az izolált, permeabilizált cardiomyocytákhoz visszaadtuk a mosás során eltávolított citoszolt ~1 mg myocytá fehérje/ml koncentrációban. Az aktivációk során a rekonstruált, szívizomsejteket 10 illetve 30 percig inkubáltuk (mérések erőmérő rendszeren vagy biokémiai módszerekkel) forbol-mirisztol-acetát (PMA, 10  $\mu\text{mol/L}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  és PKC, GF 109207X és Gö 6976 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) jelenlétében vagy hiányában. A különböző biokémiai mérések során sejteket 3 alkalommal mostuk 450  $\mu\text{l}$  izoláló oldattal (centrifugálás: 1000 rpm, 2 perc), az inkubáció során alkalmazott kalcium és PMA koncentrációt is figyelembe véve. Ezt követően a homogenizátumot 5 percig főztük 60  $\mu\text{l}$  SDS-mintapufferrel (Sigma, St. Louis, MO, USA), majd 30  $\mu\text{l}$  mintát felhasználva molekulásúly szerint SDS-elektroforézissel szétválasztottuk és Western immunoblottal detektáltuk a fehérjéket.

### 1.2.2 In vitro foszforiláció

A humán szívizom homogenizátumokat rekombináns protein kináz C (PKC) $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  és  $\eta$  (Biomol, Plymouth Meeting) izoenzimekkel 60 percig 37°C –on inkubáltuk 10 mmol/L magnéziumion, 100  $\mu\text{mol/L}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (ICN) jelenlétében HEPES pufferben. A rekombináns PKC izoenzimek kináz aktivitásának mérésére 1 mg/ml hiszton IIIS (Sigma) szubsztrátot alkalmaztunk.

A foszforiláció autoradiográfiával történő kimutatásához a reakciót hideg aceton hozzáadásával állítottuk le. Az elegyet 10 percig jégen tartottuk, majd a kicsapódott fehérjéket centrifugálással választottuk el. A csapadékot 50  $\mu\text{l}$  SDS mintapufferrel (Sigma) 5 percig forraltuk, majd a fehérjéket SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztottuk. A géleket ezután Coomassie festékkel festettük. A fehérjékbe épült  $^{32}\text{P}$ -t a gélek szárítását követően autoradiográfiával detektáltuk.

Ezzel párhuzamosan 5  $\mu\text{l}$  mintát P81 foszfocellulóz papírra (Whatmann) cseppentettünk. A szubsztrátfehérjékbe épült  $^{32}\text{P}$  mennyiségét a papírok 0.5% -os foszforsavas mosása és acetonnal történő szárítása után TriCarb (PerkinElmer Life Science) szcintillációs számlálóban határoztuk meg.

### 1.2.3 Western blot

A szívizomzatot ebben az esetben RIPA-pufferrel (1% Igepal CA-630, 0,5% Na-deoxycholat, 0,1% Na-dodecilszulfát, 2 v/v% fehérje inhibítor koktél; pH 7,4) homogenizáltuk. A frakciók fehérjetartalmát BCA assay-vel (Sigma, St. Louis, MO, USA) határoztuk meg, BSA standard alapján. A homogenizátumok koncentrációját 4 mg/ml-re állítottuk be. A homogenizátumot SDS-mintapufferben (Sigma) 10 percig

főztük. Minden mintából 50 µg fehérje homogenizátumot illetve kontrollként humán rekombináns PKC izoenzimeket (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vittünk fel 10 %-os gradiens gélre (Bio-Rad Laboratories). A molekulásúly szerint szétválasztott fehérjéket 1 %-os tejporban blokkoltuk 1 óráig, majd az 1%-os tej-PBS-ben hígított elsődleges PKCα (Sigma-Aldrich, St. Louis, 1:5 000) PKCδ és PKCε (mindkettő Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, 1:1 000) ). ellenes antitesttel inkubáltuk. A membránokat ezt követően megfelelő másodlagos torna-peroxidázzal kapcsolt antitesttel (Sigma-Aldrich, St.Louis, 1:50 000) inkubáltuk. A jeleket felerősített chemilumineszcencia (ECL) (PerkinElmer Life Science) segítségével autoradiographiás filmen (Primax RTG-B) vizualizáltuk. A filmekken kapott sötét sávok reprezentálták a PKC izoenzimeket.

#### **1.2.4. PKC izoenzimek transzlokációja**

A membránrendszerüktől megfosztott szívizomsejtekhez visszaadtuk a citoszolt (1 mg/ml, 450 µl/cső) és szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk kalcium jelenlétében (5 mmol/L) vagy hiányában, valamint forbol-mirisztát-acetát (PMA, 10 µmol/L) jelenlétében vagy hiányában. A sejteket 3 alkalommal mostuk izoláló oldattal (centrifugálás: 1000 rpm, 2 perc), az inkubáció során alkalmazott kalcium és PMA koncentrációt is figyelembe véve. Ezt követően a mintákat 5 percig főztük 60 µl SDS-mintapufferrel (Sigma, St. Louis, MO, USA), majd 30 µl mintából a PKCα, β1, δ és ε fehérjék mennyiségét határoztuk meg. A fehérjék kimutatására ebben az esetben is peroxidáz konjugált másodlagos antitesteket, Western immunoblot és ECL módszereket alkalmaztunk. A sávok intenzitását ImageJ software felhasználásával mértük, az értékeket OD-ben határoztuk meg.

#### **1.2.5. Citoszol szabad kalcium koncentrációjának meghatározása**

PKCα kalcium függő transzlokációjának vizsgálatakor a membránrendszerétől megfosztott szívizomsejteket a citoszol és 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5 vagy 10 mmol/L hozzáadott Ca<sup>2+</sup> jelenlétében illetve kalcium mentes oldatban inkubáltuk. A szabad kalcium koncentráció meghatározása Fluo-3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) szubsztrát segítségével történt. A fluoreszcencia intenzitásokat fluorescence plate reader (NOVOstar, BMG Labtech, Offenburg, Germany) használatával 10 és 30 perces inkubációs idővel 490 nm-es gerjesztés és >520 nm-es emissziós hullámhossz mellett detektáltuk. Az eredmények és a kalibrációs görbe értékelése Graphpad 4.0 Software segítségével történt.

### **1.2.6. Gel-overlay assay: PKC $\alpha$ -kötő fehérjék**

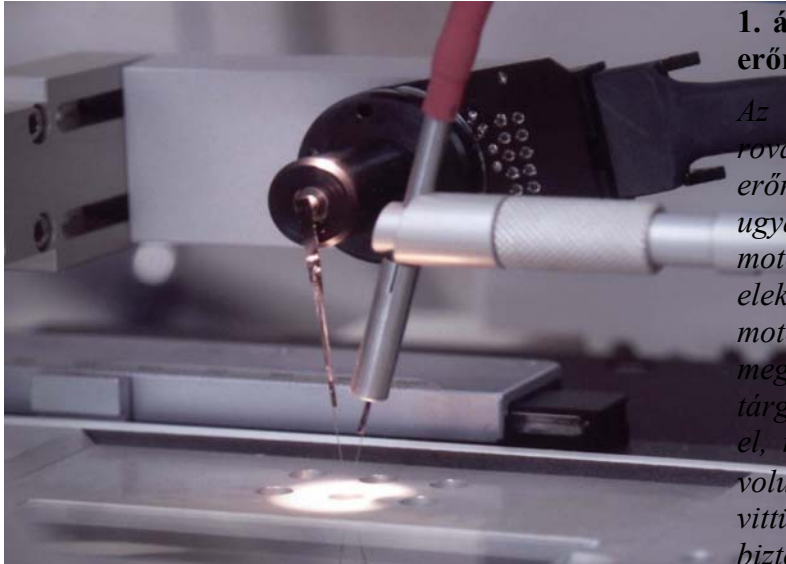
Az izolált, permeabilizált cardiomyocytyákat SDS-mintapufferben főztük, SDS poliakrilamid gélen futtattuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránok blokkolását követően 2 órán át inkubáltuk azokat 1%-os tej-TBS-ben 2  $\mu\text{g/ml}$  tisztított, rekombináns PKC $\alpha$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10  $\mu\text{mol/L}$  forbol-mirisztát-acetát (PMA) és 5  $\text{mmol/L}$  Ca $^{2+}$  jelenlétében. A kontroll membránokhoz nem adtunk tisztított, rekombináns PKC $\alpha$ -t. A membránokat 3 alkalommal mostuk 5  $\text{mmol/L}$  Ca $^{2+}$ -mal kiegészített TBS-ben, majd PKC $\alpha$  ellenes elsődleges antitesttel inkubáltuk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 1:20,000). A fehérjék kimutatására ebben az esetben is peroxidáz konjugált másodlagos antitesteket, Western immunoblot és ECL módszereket alkalmaztunk

### **1.2.7. Rekombináns human PKC $\alpha$ in vitro kötődésének vizsgálata rekombináns kardialis TnI-hez és troponin komplexhez**

Rekombináns, tisztított PKC $\alpha$ -t (0.1  $\mu\text{g}$ , Sigma-Aldrich,) inkubáltunk rekombináns, tisztított TnI (0.1  $\mu\text{g/ml}$  TnI) és rekonstruált troponin komplex (0.3  $\mu\text{g/ml}$ , 1:1:1 sztöchiometriai arányban TnI:TnC:TnT) molekulákkal Ca $^{2+}$  jelenlétében (5  $\text{mmol/L}$ ) és hiányban szobahőmérsékleten 2 órán át. A TnI és a Tn complex immunprecipitációjához a homogenizátumokat 30  $\mu\text{l}$  protein A sepharose CL-4B gyanta (Amersham Biosciences AB) jelenlétében szobahőmérsékleten 60 percig 1  $\mu\text{g}$  anti-TnI antitesttel (Sigma-Aldrich) vagy kontrollként ugyanilyen mennyiségű egér IgG-vel (Zymed Laboratories) inkubáltuk. A gyantához kötött komplexeket 5 alkalommal mostuk immunprecipitációs pufferrel (centrifugálás: 1800 rpm, 1 perc), az inkubálásnak megfelelő kalcium jelenlétében. Ezt követően az immunkomplexeket tartalmazó üledékeket 10 percig főztük SDS-mintapufferrel (Sigma-Aldrich), majd a minták egyik feléből a TnI fehérjék mennyiségét határoztuk meg, másik feléből az immunprecipitáció hatékonyságát ellenőriztük. A fehérjék kimutatására ebben az esetben is peroxidáz konjugált streptavidint, Western immunoblot és ECL módszereket alkalmaztunk.

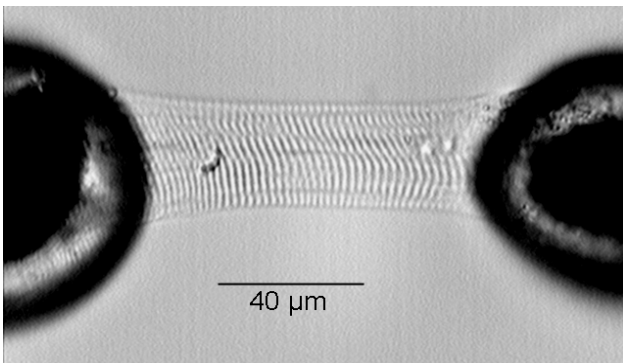
### **1.3. Mechanikai mérések izolált szívműködéseken**

Az izolált, permeabilizált cardiomyocytyákat szilikon ragasztóval egy érzékeny erőmérőhöz és egy piezoelektromos motorhoz rögzítettük (1. ábra).



**1. ábra. Az izolált szívizomsejtek rögzítése az erőmérő rendszerhez**

*Az izolált szívizomsejt egyik végét olyan rovartühöz ragasztottuk, mely egy érzékeny erőmérő toldaléka (jobb oldal), másik végét ugyanilyen módszerrel egy piezoelektromos motorhoz (bal oldal) rögzítettük. A tűk mozgását elektromotoros mikromanipulátorokkal illetve a motor számítógépes vezérlésével valósítottuk meg. A szívizomsejtet övező oldatok cseréjét a tárgyasztal oldalirányú mozgatása révén értük el, melynek során a preparátumot az egyik kis volumenű oldatcseppből (kb. 55  $\mu$ l) a másikba vittük át. A mérőkád folyamatos hűtésével biztosítottuk a mérésekhez szükséges hőmérsékletet.*



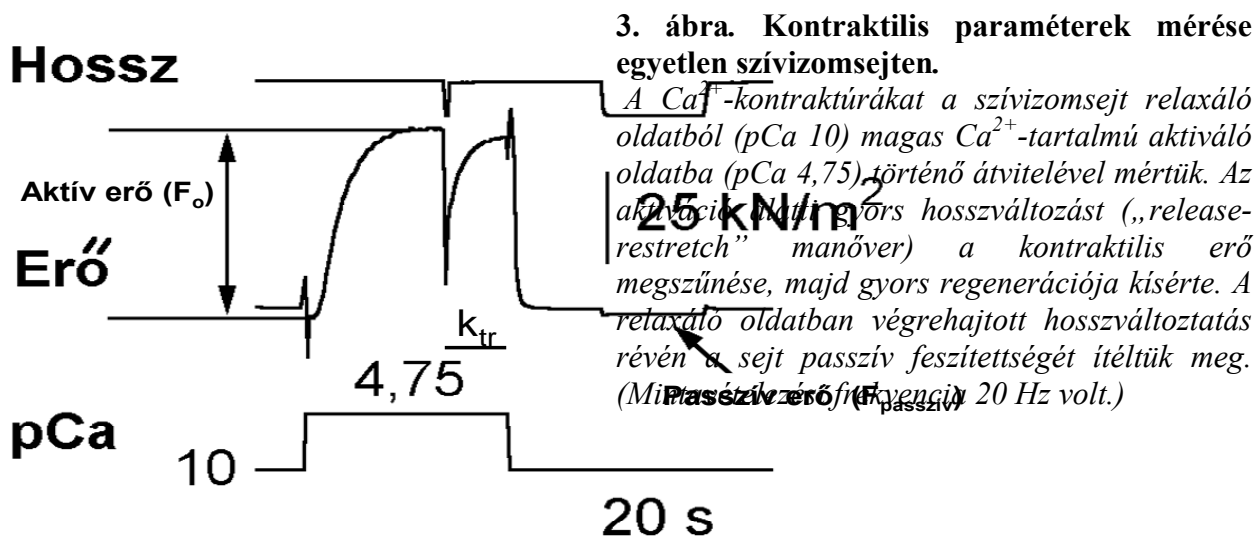
**2. ábra. Izolált és membránrendszerétől megfosztott szívizomsejt.**

*A vizsgálni kívánt izolált cardiomyocytát invertáló mikroszkóp tárgyasztalán szilikon ragasztóval a két vékony rozsdamentes acéltűhöz ragasztottuk. Az átlagos sarcomerhosszt relaxáló oldatban 2,2  $\mu$ m-re állítottuk.*

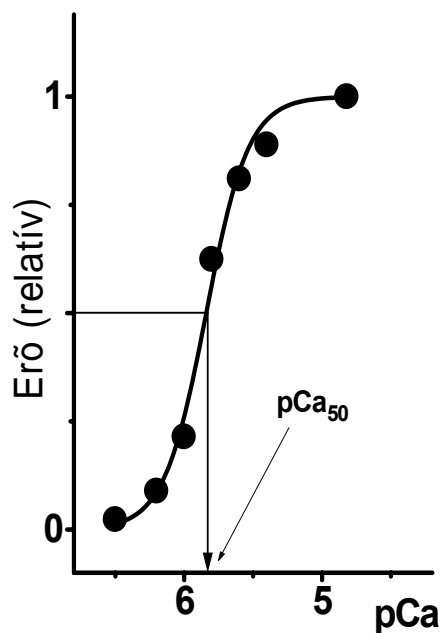
A mérésekhez szükséges relaxáló és aktiváló oldatok összetételét számítógépes program (Fabiato & Fabiato, 1979) szerint határoztuk meg. A kiindulási relaxáló és aktiváló oldatok  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációja pCa ( $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció 10-es alapú negatív logaritmus) 10 és pCa 4,75 volt. A pCa 4,75 értéknél kisebb  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú aktiváló oldatokat ezen kiindulási oldatok elegyítésével állítottuk elő. A szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -kontraktúráit izometriás körülmények között 15°C-on mértük. A sejtek aktiválása előtt a sarcomerek átlagos hosszát a mikroszkóphoz kapcsolt számítógépes videojel feldolgozó rendszer segítségével 2,2  $\mu$ m-re állítottuk be.

A mérések során a szívizomsejt relaxáló oldatból aktiváló oldatba történő átvitelét a kontraktilis erő fokozódása követte (3. ábra). A maximális  $\text{Ca}^{2+}$  aktivált erő kifejlődése után egy úgynevezett „release-restretch” manővert végeztünk, melynek során a sejtet eredeti hosszának 20%-ával megrövidítettük, majd

ezt követően visszaállítottuk a kiindulási hosszat. Ezt a mérőrendszer az előzetesen beállított protokoll szerint az elektromágneses motorhoz rögzített rovartű mozgásával hajtotta végre. Az igen nagysebességű, 20 msec alatt kivitelezett, hossz-változtatás során a kialakult aktin-miozin keresztkötések döntő többsége felszakadt, majd azok újból felépültek. Ezt az eseményt a regisztrátumon a kontraktilis erő megszűnése, majd annak gyors regenerációja kísérte. Az erő regenerációjának üteme elsősorban az aktin-miozin ciklus sebességétől függött, melyet a  $k_{tr}$  paraméterrel jellemeztünk. A  $k_{tr}$  paramétert az erő görbék „release-restretch” manővert követő részének illesztésével lehetett becsülni. Az izometriás csúcserőt, mely az aktív ( $F_o$ ) és passzív ( $F_{passzív}$ ) komponensek összege, a gyors rövidüléssel párhuzamos hirtelen erőcsökkenésből határoztuk meg. Ezt követően a relaxáló oldatban kivitelezett, lényegesen hosszabb ideig tartó „release-restretch” manőver révén a sejt passzív erőkomponensét mértük (3. ábra).



Az izometriás erőmérés során a kialakult maximális feszülést mind analóg módon, mind digitális jelek formájában egyedi fejlesztésű komputer program segítségével regisztráltuk. Az ASCII formátumú mérési eredményeket egyesével olvastuk be az Origin 6.0 grafikus program erre a célra definiált adatfeldolgozó rutinjába. A kontrakció amplitudóját különböző, egyre csökkenő  $Ca^{2+}$ -koncentrációjú ( $pCa$  4,75 -  $pCa$  7,0) aktiváló oldatokban határoztuk meg. Ezek segítségével szerkesztettük meg a sejtre jellemző  $Ca^{2+}$ -érzékenységi görbét. A félmaximális erőt eredményező  $Ca^{2+}$ -koncentráció, az úgynevezett  $pCa_{50}$  érték, a  $Ca^{2+}$ -érzékenységet önmagában jellemző számadat (4. ábra).



**4. ábra. Az izometriás erő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének mérése egyetlen szívizomsejten.**

*Az aktivációk során kialakuló aktív erőt a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció (pCa) függvényében ábrázolva minden egyes sejtnek megszerkesztettük a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységi görbét. A félmaximális erő létrejöttéhez szükséges  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció (pCa<sub>50</sub>) a sejt  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét közvetlenül jellemző adat.*

### 1.3.1. PKC aktiváló és gátló ágensek hatásának tanulmányozása mechanikai mérőrendszeren

A különböző kontraktilis paramétereket kontroll körülmények között, PKC aktiváló és gátló szerek alkalmazása előtt, és ezek alkalmazását követően is meghatároztuk. Kísérleteinkben PKC aktiváló szerként kalciumot, PMA-t, gátlószerként GF 109207X-t, nem szelektív PKC inhibitort és Gö 6976-t, szelektív Ca-dependens PKC  $\alpha$  és  $\beta$ I inhibitort használtunk. Az inkubációs idő 10 perc volt. További kísérleteinkben ezen szerek alkalmazásával tanulmányoztuk hatásuk következtében kialakuló kontraktilis változásokat ( $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység, aktin-miozin ciklus sebessége). Ehhez kontroll körülmények között felvett  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés meghatározását követően, 10  $\mu\text{M}$  PMA és 10  $\mu\text{M}$  GF 109207X illetve 10  $\mu\text{M}$  Gö 6976 koncentrációk mellett inkubáltuk a preparátumokat. Majd ismételt  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés felvételét követően ezek hatását egy második  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés regisztrálásával vizsgáltuk. A rendszerbe az endogén PKC molekulákat a felülúszó (citoszol) visszaadásával biztosítottuk.



## 1.4. Statisztikai módszerek

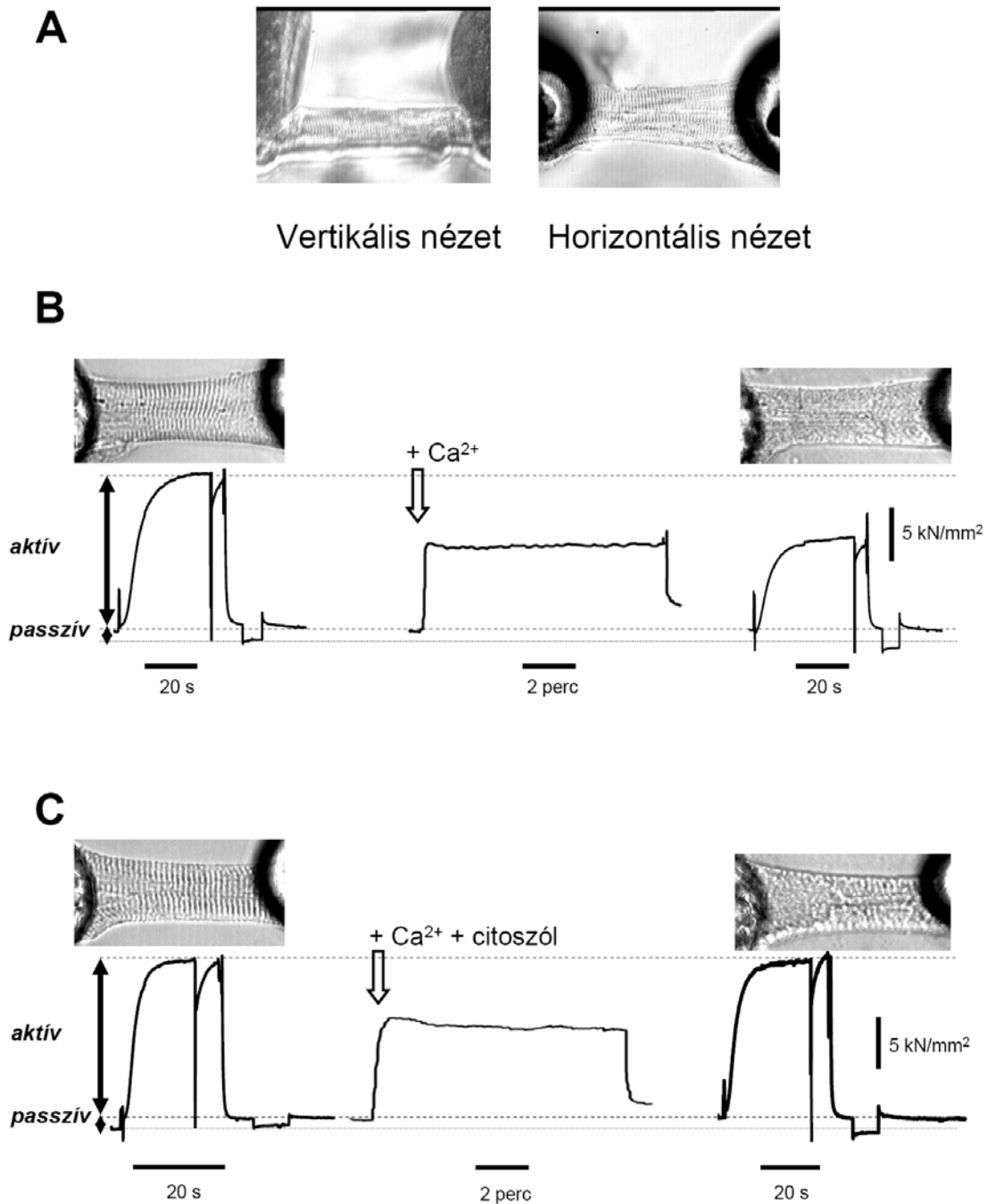
A nyert adatokat Microsoft Excel program segítségével táblázatos formában rendeztük. Az ábrákat és az illesztéseket részben az Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., MA, USA), részben a Graph Pad 4.0 program segítségével készítettük el. A bemutatott adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel. Az egyes kísérletekhez tartozó elemszámot a megfelelő ábrák alatt tüntettük fel. Az átlagok közötti különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a Student-féle  $t$ -próba (ugyanazon sejten végzett kísérletek esetében páros, egyéb esetekben páratlan próbát használva) eredményeként a kapott  $p$  érték kisebb volt 0,05-nél.

A Western immunoblot során az egyes minták fehérjemennyiségét -ellenőrzésképpen - Ponceau-vörös festés után denzitometriás analízissel hasonlítottuk össze. Az eredményeket 4-10 független kísérlet elvégezése alapján kvantitáltuk. Az értékeket átlag  $\pm$  S.E.M. formában fejeztük ki. A különbségeket a Student-féle  $t$ -próba segítségével  $P < 0,05$ -es szignifikancia szint mellett tekintettük szignifikánsnak.

## 2. Eredmények

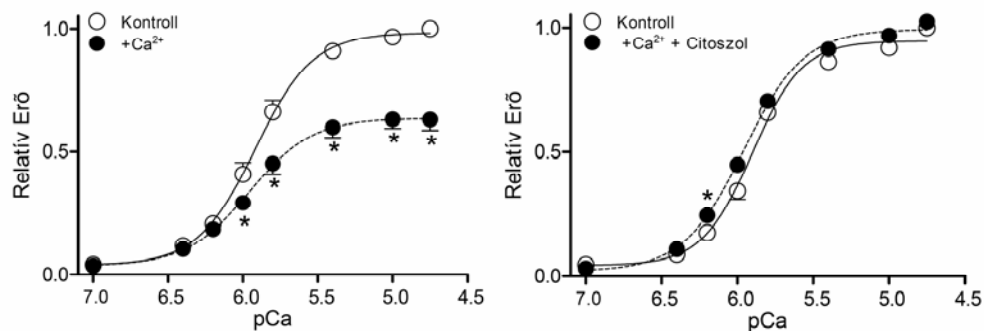
### 2.1. Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívizom sejtek kalcium aktiválta kontraktilis erejére

A permealizált human kamrai szívizomsejteket félmaximális kontrakciót kiváltó  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció mellett (pCa 5,8; a kifejlődő aktív erő a maximum  $62 \pm 1\%$ -a) inkubáltuk 10 percig. Ez a kezelés a maximális  $\text{Ca}^{2+}$  aktivált kontrakciós erő  $37 \pm 5\%$ -os csökkenését eredményezte ( $n=6$  kísérlet, 5B. és 6. ábrák). Ezzel szemben, a citoszol jelenlétében hasonló módon kezelt sejtek (kontrakciós erő az inkubáció alatt: a maximum  $56 \pm 8\%$ -a) az erőcsökkenéstől teljes mértékben védettek voltak ( $2 \pm 3\%$ -os erő növekedés a kezelés végére,  $n=5$ , 5C és 6. ábrák). A mechanikai változásokkal párhuzamosan a sejtek szerkezetében (harántcsíkolt) bekövetkező változásokat is rögzítettük. Mint az az 5. ábra képein látható, a fénymikroszkópos harántcsíkolt mindkét kezelést követően jelentősen elmosódott. A továbbiakban a citoszolikus fehérjék hozzájárulását vizsgáltuk.



#### 5. ábra Citoszol kezelés hatása a kontraktilis erőre

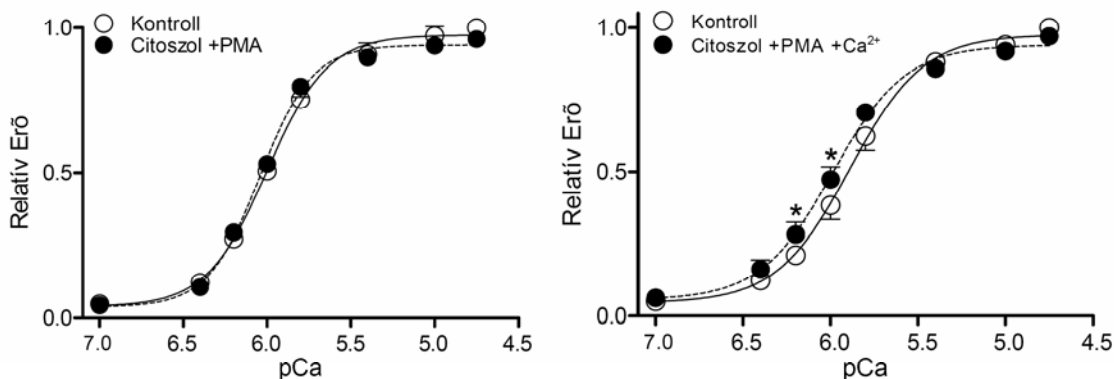
A vizsgálni kívánt izolált cardiomyocytát invertáló mikroszkóp tárgyasztalán szilikon ragasztóval a két vékony rozsdamentes acéltűhöz ragasztottuk (A panel). Az átlagos sarcomerhosszt relaxáló oldatban 2,2  $\mu\text{m}$ -re állítottuk. A mechanikai tulajdonságokat ugyanazon a sejten Ca<sup>2+</sup> kezelés előtt, közben és után mértük a citoszol frakciól hányában (B panel) ill. jelenlétében (C panel).



#### 6. ábra Citoszol kezelés hatása a kontraktilis erőre: pCa-erő összefüggés

Az ábra bal oldalán  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében ( $n=6$ ), míg a jobb oldalán  $\text{Ca}^{2+}$  és citoszol ( $n=5$ ) jelenlétében mért relatív Ca-erő értékeket tüntettük föl. (\* $p<0,05$  vs. kontroll)

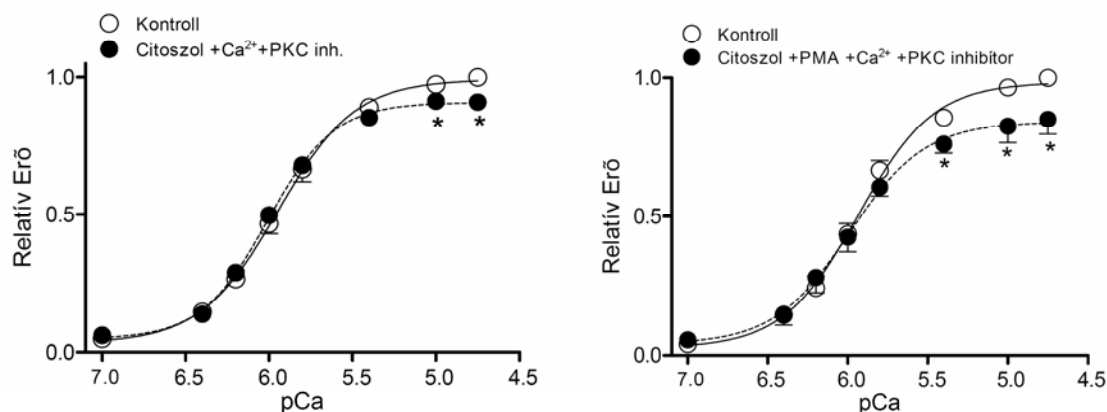
A számos jelölt fehérje közül figyelmünket a protein kináz C-re irányította az a tény, hogy ez az enzim (i) képes a miokardiális kontraktilitás szabályozására; (ii) gyakran transzlokálódik a citoszomból a partikuláris frakciókba; (iii)  $\text{Ca}^{2+}$ -mal aktiválható. Az általános PKC aktiválószer PMA (10 perces kezelés) nem volt hatással sem a kontraktilis erőre, sem a citoszol mediált védelemre (7. ábra).



#### 7. ábra PKC szerepe a kontraktilis erő szabályozásában: aktiváció

A 6. ábránál leírtakhoz hasonló kísérletes körülmények között mért szubmaximális erő értékeket normalizáltuk a maximális erőértékekre. Az ábra bal oldalán a PKC aktivátor PMA hatása látható  $\text{Ca}^{2+}$  hiányában ( $n=5$ , citoszol+PMA), a jobb oldalán pedig ( $n=10$ , citoszol+PMA+  $\text{Ca}^{2+}$ )  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében. (\* $p<0,05$  vs. Kontroll)

Ezzel szemben a PKC gtlása akár GF 109203X-vel, akár Gö 6976-val (10  $\mu\text{mol/L}$ ) részben felfüggesztette a citoszol mediált védelmet (a maximális  $\text{Ca}^{2+}$  aktivált erő csökkenése  $15 \pm 5$  %-kal,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ , illetve  $9 \pm 2$  %-kal,  $p < 0.05$ ,  $n=8$ , a fenti sorrendben, mint az a 8. ábrán látható).



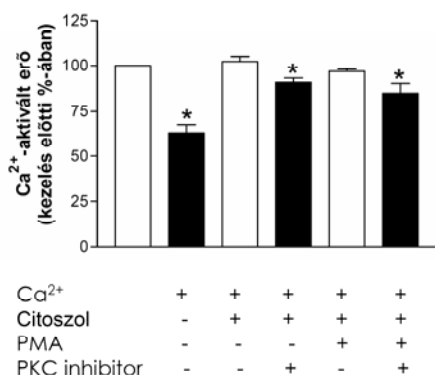
### 8. ábra PKC szerepe a kontraktilis erő szabályozásában: gátlás

A 6. ábránál leírtakhoz hasonló kísérletes körülmények között mért szubmaximális erő értékeket normalizáltuk a maximális erőértékekre. Az ábra bal oldalán PKC inhibitor Gö-6976 ( $n=8$ ) jobb oldalán a PKC inhibitor GF109203X ( $n=6$ ) hatása látható (\* $p < 0,05$  vs. Kontroll)

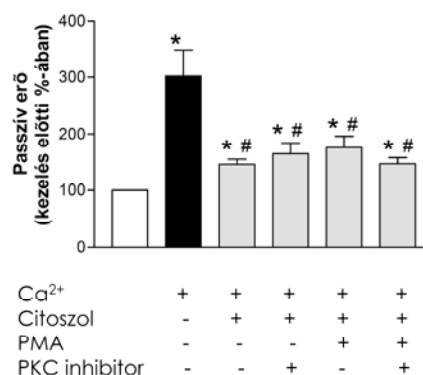
Mindemellett a GF 109203X nem mutatott hatást a 10 perces  $\text{Ca}^{2+}$  kontraktúra hiányában (a maximális erő  $2 \pm 3\%$ -os növekedése,  $n=5$ , lásd 1. táblázat).

## 2.2. Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívizom sejtek passzív feszülésére

Az izolált szívizomsejtek kalcium független passzív erejét 2.2  $\mu\text{m}$  szarkomerhosszon vizsgáltuk. Ellentétben a  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválta maximális aktív erővel a humán cardiomyocytákban a passzív erő szignifikánsan magasabb értéket vett fel 1 mM Ca-ot tartalmazó oldattal végzett inkubáció hatására ( $F_{\text{passzív}}$ :  $302 \pm 46\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ , 9. ábra). A citoszol hozzáadása szignifikáns mértékben antagonizálta ezt a hatást ( $F_{\text{passzív}}$ :  $146 \pm 9\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n=5$ , 9. ábra). Ugyanakkor kísérleteinket PKC aktivátor PMA és nem szelektív PKC inhibitor GF 109203 valamint Gö 6976 hozzáadásával megismételve sem  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében, sem hiányában nem tapasztaltunk változás a passzív erőben.



\* P<0.05 a kontrollhoz képest



\* P<0.05 a kontrollhoz képest

# P<0.05 a Ca<sup>2+</sup> kezeléshez képest

## 9. ábra. PKC szerepe a kontraktilis erő szabályozásában: statisztika

A maximális kontraktilis erő változása. Aktív feszülés bal oldali, a passzív feszülés a bal oldali oszlopdiagrammon feltüntetve. (\* $p < 0,05$  vs. Kontroll), (# $p < 0,05$  vs. Ca-kezelt)

## 2.3. Endogén PKC által kifejtett hatás a humán kamrai szívmuscle sejtek kalcium érzékenységére

A kontraktilis rendszer kalcium érzékenysége ( $pCa_{50}$ ) és a  $Ca^{2+}$ -erő összefüggés meredekségére jellemző paraméter (nHill) nem változott szignifikánsan sem a PKC aktivációt (PMA) sem az inaktivációt (GF 109203 és Gö 6976) kiváltó kezeléseket követően. (1. táblázat)

Kezelés	n	Aktív erő (kN/mm <sup>2</sup> ) kezelés előtt	Aktív erő (relatív) kezelés után	Passzív erő (kN/mm <sup>2</sup> ) kezelés előtt	Passzív erő (relatív) kezelés után	pCa50		Hill	
						kezelés előtt	kezelés után	kezelés előtt	kezelés után
+Ca <sup>2+</sup>	6	24.17±3.79	63±5*	1.89±0.20	302±46*	5.92±0.04	5.97±0.03	2.06±0.12	1.94±0.34
Citoszol + Ca <sup>2+</sup>	5	19.80±2.84	102±3	1.61±0.24	146±9*	5.89±0.02	5.97±0.02*	2.03±0.21	2.10±0.10
Citoszol + PMA	5	21.02±4.20	96±1	2.05±0.51	115±11	6.00±0.03	6.05±0.01	2.06±0.16	2.58±0.20
Citoszol + GF	5	25.96±4.72	102±3	1.56±0.41	92±6	5.96±0.06	6.03±0.04*	1.65±0.16	2.14±0.16*
Citoszol + PMA + Ca <sup>2+</sup>	10	21.67±3.04	98±1	2.07±0.24	176±20*	5.90±0.04	6.04±0.05*	2.10±0.28	2.09±0.19
Citoszol + Ca <sup>2+</sup> + Gö	8	28.87±2.90	91±2*	2.57±0.57	165±19*	5.94±0.03	6.04±0.03*	1.82±0.20	1.97±0.13
Citoszol + PMA + Ca <sup>2+</sup> + GF	6	22.48±3.24	85±5*	2.58±0.23	147±11*	5.92±0.03	6.01±0.05*	1.84±0.12	2.08±0.29

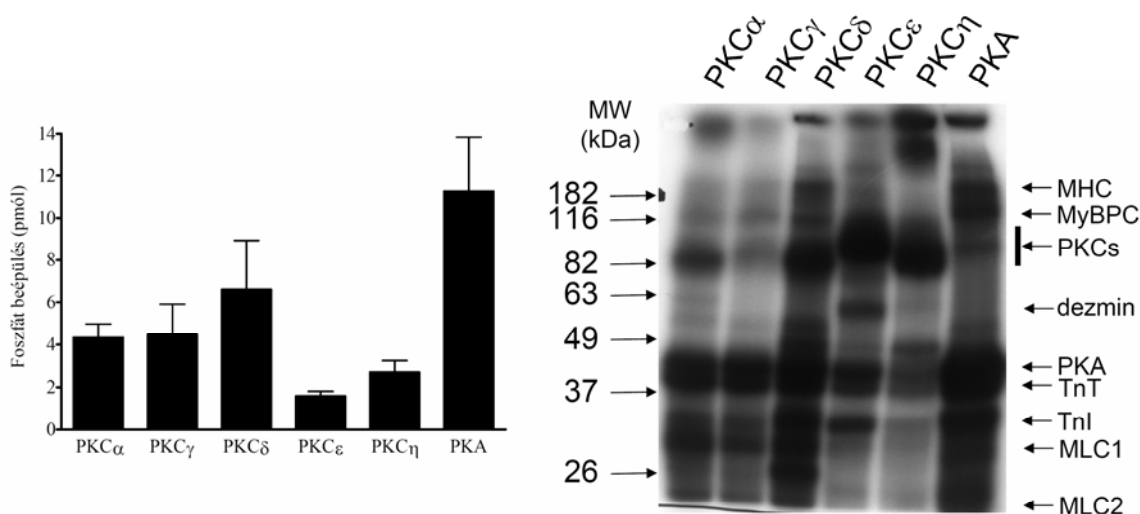
## 1. Táblázat. A kontraktilis paraméterek értékei

## 2.4. PKC izoenzimek expressziója humán kardiomyocytákban

Három PKC izoforma expressziós szintjét ( $\alpha$ ,  $\delta$  és  $\epsilon$ ) vizsgáltuk humán szívizom- homogenizátumokban immunoblot módszerrel, specifikus antitesteket alkalmazva. Az elvégzett kísérletek igazolták, hogy a humán szívizomban legnagyobb mennyiségben előforduló izoforma a PKC  $\alpha$ , expressziós szintje közel húszszor nagyobb, mint a vizsgált másik két izoformáé, a PKC deltáé és epszilonné ( $189 \pm 31$ ,  $7 \pm 3$ ,  $7 \pm 2$  ng/mg).

## 2.5. PKC *in vitro* foszforiláció

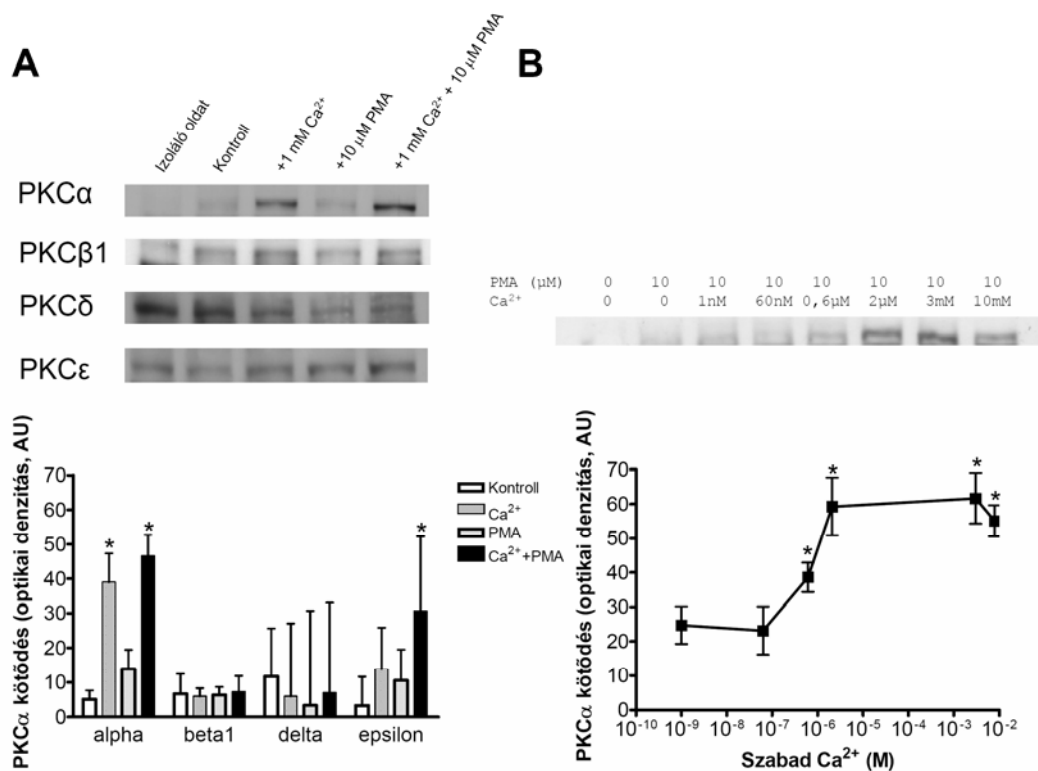
Következő lépésben meghatároztuk rekombináns PKC felhasználásával a humán szívizom kontraktilis fehérjéinek foszforilálhatóságát és autoradiográfiával azonosítottuk a szubsztrátok molekulaméreteit. Az izoenzimek közötti különbségek nemcsak az aktiváló kofaktorok iránti igényben, szöveti expresszióban, lokalizációban mutatkoznak meg, hanem az eltérő szubsztrátokban is. A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependens PKC $\alpha$  és  $\gamma$  közel azonos aktivitást ( $4,3 \pm 0,9$  és  $4,4 \pm 2,1$  pmol/min) és szubsztrát specifitást mutatott, míg a Ca-független izoformák meglehetősen egyedi mintázattal bírtak. A PKC $\delta$  izoenzimnek volt a legnagyobb kináz aktivitása ( $6,6 \pm 3,3$ ), és szelektíven foszforilálta a 26 kDa molekulatömegű fehérjét. Míg a PKC $\epsilon$  aktivitása adódott a legalacsonyabbnak ( $1,6 \pm 0,3$ ), szubsztrátspecifitást egy 60 kDa. molekula tömegű fehérjenél mutatott. A PKC $\eta$  által foszforilált két fehérje molekulamérete is eltérő,  $>200$  kDa és 48 kDa volt.



10. ábra. Miokardiális PKC szubsztrátok azonosítása: *in vitro* foszforiláció.

## 2.6. PKCalfa intracellularis target fehérjéinek kimutatása

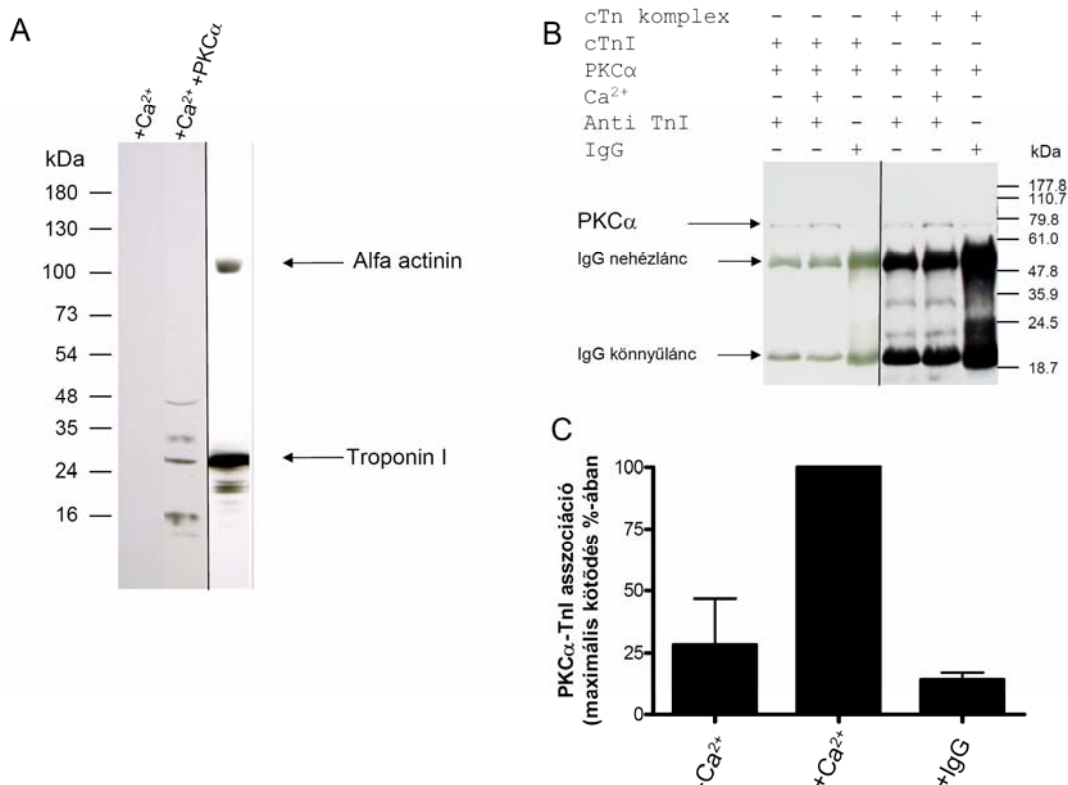
Kísérleteinket endogén PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\delta$  és  $\epsilon$  izoformáknak citoszolból a kontraktilis fehérjékhez történő transzlokációjának vizsgálatával folytattuk. Kontroll körülmények között, Ca<sup>2+</sup> hiányában az izoenzimeket túlnyomórészt a citoszolban lehetett kimutatni, csak csekély mértékű asszociáció volt megfigyelhető a PKC izoenzimiek és a kontraktilis fehérje rendszer között (11A. ábra). Ca<sup>2+</sup> jelenlétében a PKC alfa kötődése a kontraktilis rendszerhez szelektíven nőtt (11A. ábra). A széles körben használt PKC aktivátornak a PMA-nak egymagában nem volt megfigyelhető szignifikáns hatása a PKC izoenzimiek és a kontraktilis apparátus közti interakcióra. Ca<sup>2+</sup> és PMA együttes jelenlétében PKC alfa és epsilon szignifikáns transzlokációja volt megfigyelhető. Eredményeink egyértelműen azt sugallják, hogy döntően a Ca<sup>2+</sup>-nak van szerepe a PKC alfa transzlokációjának szabályozásában. PKC alfa transzlokáció Ca-függés vizsgálatakor a félmaximális aktivációhoz szükséges Ca<sup>2+</sup> koncentráció (EC<sub>50</sub>) EC<sub>50</sub>=645 nmól/l.



**11. ábra PKC izoenzimiek Ca<sup>2+</sup> dependens transzlokációja humán szívizomsejtekben**  
 Az A panelen az intenzíven festődő sávok a membránrendszerüktől megfosztott myocytákhoz visszaadott felülúszóban található PKC izoenzimiek transzlokációját igazolják a kontraktilis rendszerhez. A Ca-mentes közegben inkubált kontroll minta esetén halvány jelölődést látunk. Ca<sup>2+</sup> hozzáadására a PKC alfát jelölő sáv intenzitásának mértéke fokozódik. A B panel felső részén látható, hogy a PKC alfa kontraktilis rendszerhez való asszociációjának jelentős Ca-függése van. Ennek a 80 kDa molekulatömegű fehérjének megfelelő sáv jelölődése fokozódik a Ca koncentráció növelésével.

## 2.7. Ca-függő cTnI és PKC $\alpha$ interakció

A PKC alfa és potenciális horgonyzó fehérjét overlay assay-vel vizsgáltuk membránrendszerüktől megfosztott humán szívizomsejteken. A miofibrilláris rendszer öt fehérjét találtuk lehetséges PKC alfa kötő fehérjének. Ezek közül az egyik a ~ 24 kDa tömegű TnI, melynek megfelelően intenzív jelölődés látszik a membránon (12A ábra). *In vitro* fehérjekötéses analízissel megállapítottuk, hogy a tisztított, rekombináns TnI és PKC $\alpha$  molekulák között Ca-dependens kölcsönhatás van (12B és C panel). Ugyanakkor ezt a hatást nem befolyásolta az a tény, ha a TnI molekula Tn-komplexben (TnI:TnT:TnC aránya 1:1:1) szerepelt (12B panel).



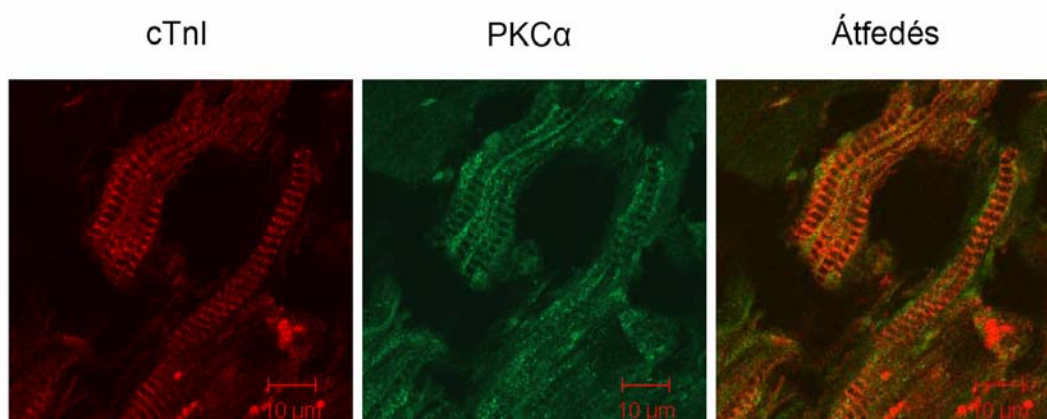
### 12. ábra Humán kardiális Tn I, mint PKC $\alpha$ kötő fehérje

PKC alfa és potenciális horgonyzó fehérjét overlay assay-vel vizsgáltuk membránrendszerüktől megfosztott humán szívizomsejteken. A miofibrilláris rendszer öt fehérjét találtuk lehetséges PKC alfa kötő fehérjének. Ezek közül az egyik a ~ 24 kDa tömegű TnI, melynek megfelelően intenzív jelölődés látszik a membránon (A panel). *In vitro* fehérjekötéses analízissel megállapítottuk, hogy a tisztított, rekombináns TnI és PKC $\alpha$  molekulák között Ca-dependens kölcsönhatás van (B és C panel). Ugyanakkor ezt a hatást nem befolyásolta az a tény, ha a TnI molekula Tn-komplexben (TnI:TnT:TnC aránya 1:1:1) szerepelt (B panel).



## 2.8. PKC alfa és cTnI együttes előfordulásának (kolokalizáció) kimutatása humán kamrai izomzatban

Habár a PKC alfa többsége a citoszolban expreszálódik, ami megegyezik az alacsony kalcium koncentrációjú, nyugvó állapotú sejtekben megfigyelttel, a biokémiai eredményeinkkel összhangban az immunfluoreszcens felvételeken szignifikáns PKC alfa és cTnI kolokalizáció figyelhetünk meg humán kamrai szövet mintákban.



### 13. ábra PKC alfa és cTnI együttes előfordulásának (kolokalizáció) kimutatása humán kamrai izomzatban.

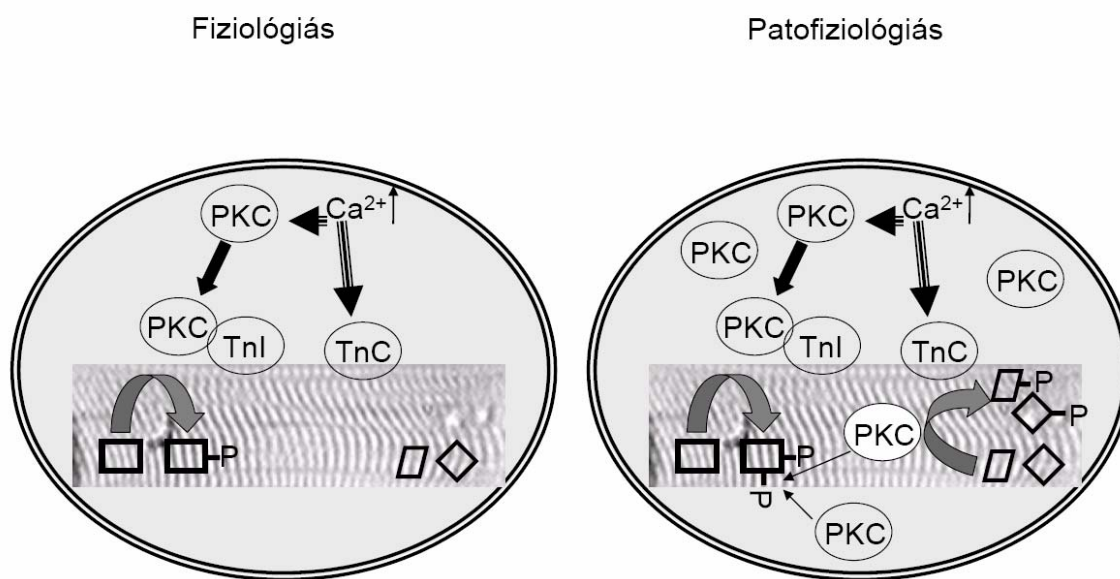
A TnI-t vörös (A panel), a PKC alfát zöld (B panel) fluoreszcencia jelöli, a közös előfordulás helyén sárga (C panel) színt kaptunk.

## 3. Megbeszélés

Kísérleteinkben a protein kináz C funkcionális jelentőségét mutattuk ki a human szívizomzat kontraktilis erejének fenntartásában. Kimutattuk továbbá a PKC  $\text{Ca}^{2+}$  függő transzlokációját a miokardiális troponin I-hez. Fontos megemlíteni, hogy a PKC gátlása *in vitro* körülmények között gyakran hatásos a különböző szívbetegségek (pl. szívinfarktus során megjelenő ischameiás reperfüziós károsodás, illetve a szívelégtelenség) során bekövetkező kontraktilitás csökkenés megelőzésében. Sajnos, a PKC a szervezet minden sejtípusában expreszálódik és változatos gunkciókat lát el. Ennek megfelelően a PKC minden sejtre kiterjedő gátlása nem alkalmazható, így a PKC aktivitás modulálásán alapuló terápiás eljárások a megfelelő specifitás eléréséig váratnak magukra.

Kísérleteink ezen a téren jelentős előrelépéssel szolgáltak, amennyiben kimutattuk, hogy a PKC miofibrilláris hatásainak közvetítésében részt vesz a troponin I általi célra irányítása (targeting). Így felmerül annak a lehetősége, hogy a PKC troponin I asszociációjának gátlása/segítése révén a PKC miofibrilláris rendszerre gyakorolt hatása szelektíven modulálható.

Végül, eredményeink rámutattak arra is, hogy a PKC élettani szerepe az effigy vélnél minden bizonnyal bonyolultabb. Korábbi kísérletekben ugyanis kimutatták hogy patológiás körülmények között a PKC gátlás javította a kontraktilitást. A saját adataink ezzel szemben arra utaltak, hogy kontroll körülmények között a PKC éppen a kontraktilitás fenntartásához járulhat hozzá. A látszólagos ellentmondás magyarázata feltehetően a fiziológiás reguláció megbomlásában keresendő: pathologies körülmények között a PKC mennyisége jelentősen megnő, amely jelenség feltehetően elvezet a fiziológiás (saját adataink szerint troponin I-vel történő asszociáción keresztüli) szabályozás megbomlásához. A nem megfelelően irányított PKC aztán számos fehérjét foszforilálva káros hatással is bírhat (14. ábra).



**14. ábra. A PKC szabályozása fiziológiás és pathologies körülmények között.**

*Fiziológiás körülmények között a kontrakció során megemelkedő intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációk hatására a PKC a troponin I-hez kötődik, és a környezetben elhelyezkedő fehérjék foszforilációja révén hozzájárul a kontraktilis erő fenntartásához. Ezzel szemben pathologies körülmények között túltermelődik, ami nem csak a fiziológiás szubsztrátok fokozott foszforilációját, hanem egyéb, fiziológiás körülmények között nem foszforilálódó fehérje foszforilációját is kiváltja. Ezen túlzott működés eredménye a kontraktilitás csökkenése.*

## **A miokardiális fehérje oxidáció hatásai és a folyamat reverzibilitása**

A pályázat célkitűzéseinek megvalósítása során egyéb poszttranszlációs változások is a figyelmünk előterébe kerültek. Ezek a fehérjék poli-ADP-ribozilációjával, oxidációjával - redukciójával és foszforilációjával kapcsolatosak.

### **1. A poli-ADP-riboziláció fokozódása szívelégtelenségben (Molnár és munkatársai, *Molecular Medicine*, 2006 alapján).**

Kimutattuk, hogy humán szívelégtelenségben a poli-ADP-ribóz polimeráz enzim (PARP-1) fokozott aktivációja figyelhető meg. A PARP-1 aktivációját eredményeink szerint a szívelégtelenség során kimutatott fokozott oxidatív stressz váltja ki. A PARP-1 aktiválódásának funkcionális következményeit vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az enzim aktiválódása nem okozza a miokardiális sejtek fokozott elhalását (apoptózist), így feltehetőleg a DNS károsodás javításában játszik szerepet.

### **2. A miofibrilláris fehérjék oxidációja a kontraktilis erő csökkenéséhez vezet humán miokardiumban (Hertelendi és munkatársai, *Antioxidants and Redox Signaling*, 2008 alapján)**

Kimutattuk, hogy a szívelégtelenség során fokozódó oxidatív hatások nem csak a PARP-1 aktiválódásához vezetnek, hanem csökkentik a sejtek kontraktilis erejét is. A fehérjék oxidációján keresztül megvalósuló hatás jelentős részben az SH csoportok oxidációjának eredménye volt. Az érintett fehérjéket tekintve pedig elsősorban a vékony filamentum, így az aktin és a troponin I oxidációja jelent meg a kontraktilis erő csökkenéssel párhuzamosan. Miután az ischaemia-reperfúzió során és a szívelégtelenségben a kontraktilis erő csökkenés egyike a legfontosabb klinikai kórképeknek, megkíséreltük a redukálószeres kezelésen alapuló terápiás lehetőség ellenőrzését *in vitro*. A szívizomsejtek fehérje oxidáció során bekövetkező kontraktilis erő csökkenése mind biokémiai (fehérje SH csoportok szintjén bekövetkező), mind funkcionális (kontrakciós erő) mérésekben teljesen megfordíthatónak bizonyult megfelelő redukálószeres használata mellett. Eredményeink rámutattak, hogy a fehérje oxidáció negatív hatásai megfelelő redukálószer megfelelő koncentrációban történő alkalmazása esetében maradéktalanul kezelhetőek.

### **3. Az ischaemia-reperfúzió során megemelkedő peroxinitrit kontrakció csökkentő hatsainak feltárása humán miokardiumban (Hertelendi és munkatársai, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, in press alapján)**

Kimutattuk, hogy az ischaemia-reperfúzió (amely pl. szívinfarktust követően jelentkezik) során nagyobb mennyiségben termelődő peroxinitrit szintén csökkenti a szívizomsejtek kontraktilitását. Ennek mechanizmusát vizsgálva azt találtuk, hogy ehhez mintegy 25%-ban járul hozzá a fehérjék SH csoportjának oxidációja, míg a maradék feltehetően a tirozin oldalláncok nitrálódásának eredménye. Fontos megfigyelésünk volt, hogy a fehérje oldalláncok SH oxidációjából adódó kontraktilitás csökkenés revertálható volt, mely megfigyelés alapot teremthet a szívinfarktust követően redukálószeres kezelés alkalmazására.

### **4. A tartós PKC overexpresszió szívelégtelenséghez vezető mechanizmusának vizsgálata (Édes és munkatársai, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2008 alapján)**

Mint azt már az előzőekben kiemelttem, a PKC túltermelődése a szívelégtelenségben bekövetkezik és a betegség előrehaladásának egyik jele. A szívelégtelenség progressziójának egyik jó modellje a PKC aktiválódását kiváltó G-receptor kapcsolt q fehérje alfa alegységének túltermelődése, mely mesterségesen kiváltva szívelégtelenséghez és ebből adódó halálozáshoz vezet egérben. Ilyen állatokkal modelleztük a human szívelégtelenséget és vizsgáltuk a fokozott PKC aktiváció *in vivo* hatásait és mechanizmusát. Eredményeink arra utaltak, hogy a PKC túltermelődés hatására a miokardiális sejtek kontraktilitása csökkent, mely csökkenés részben revertálható volt a protein kináz A katalitikus alegységével történő kezeléssel. Kimutattuk továbbá, hogy a PKC túlműködés kettős hatással van a szívizomzatra: egyrészt transzkripciós változásokat vált ki, amennyiben fokozza a főtális miozin nehézlánc expressziót a kifejlett szívben megfigyelhető izoenzim rovására; és emellett csökkenti a miofibrilláris rendszeren ható protein kináz A (PKA) aktivitását. A PKA aktivitás csökkentés aztán a csökkent troponin I foszforiláción keresztül növeli a miofibrilláris rendszer  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenységét.

Ezen adataink ismét a PKC megfelelő irányításának szerepére utalnak a szívelégtelenségben. A megbomlott PKC reguláció összességében számos útvonalon keresztül képes a kontraktilis paraméterekre hatni.

## **A vanilloid receptor aktivációjának vaszkuláris hatásai**

Végül, a pályázat segítségével beszerzett vegyszerek és beállított metodikák hozzájárultak a vaszkuláris kontraktilitás terén végzett kísérleteink sikeréhez is.

### **1. Az ischameia során bekövetkező pH csökkenés hatására aktiválódó TRPV1 vaszkuláris hatásainak vizsgálata (Kark és munkatársai, *Molecular Pharmacology*, 2008 alapján)**

A vanilloid receptor (TRPV1) a fájdalmas ingerületek és így az ischaemia során bekövetkező pH csökkenés által is aktivált nem specifikus kation csatorna. Elsősorban a szenzoros neuronokban expresszálódik, így aktivációja irodalmi adatok alapján vazodilatációban nyilvánul meg a vaszkulátúra szintjén.

Saját vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a TRPV1 vaszkuláris simaizom sejtekben is expresszálódik, ahol mind *in vitro*, mind *in vivo* vazokonstriktiót vált ki. Vaszkuláris TRPV1 expressziót elsősorban a vázizmok ereiben találtunk, ennek megfelelően ezen erekben vezetett a TRPV1 aktiváció vazokonstriktióhoz. Ezzel szemben a bőr erei esetében a TRPV1 a szenzoros neuronokban expresszálódott így aktivációja az irodalomban leírtakhoz hasonlóan vazodilatatív hatású volt.

Adataink arra utalnak, hogy a vaszkuláris TRPV1 aktivitása a szöveti vérrellátás szabályozásának egy jelentős eszköze lehet.

### **2. A vaszkuláris TRPV1 fiziológiai regulációjának vizsgálata (Lizanecz és munkatársai, *Molecular Pharmacology*, 2006 alapján)**

A TRPV1 vázizom erekben kiváltott vazokonstriktív hatását vizsgálva kimutattuk, hogy a receptor endogén regulátorának gondolt anandamid hatásai elsősorban a receptor deszenzitizálásában nyilvánulnak meg. Anandamid kezelés hatására a receptor protein foszfatáz 2B által katalizált módon defoszforilálódott, mely a receptor ligand érzékenységének csökkenéséhez vezetett. Ezzel együtt azonban azt is kimutattuk, hogy anandamid kötött állapotban a receptor foszforilációs állapot függő módon viselkedett: foszforilálódva aktiválódott, míg defoszforilálódva inaktiválódott. Ezen metabolikus reguláció fiziológiai jelentősége még nem ismert.

## Irodalomjegyzék

Molnár A., Borbély A., Czuriga D., Ivetta S.M., Szilágyi S., Hertelendi Z., Pásztor E.T., Balogh Á., Galajda Z., Szerafin T., Jaquet K., Papp Z., Édes I. and Tóth A.: ***Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes.***, Journal of Biological Chemistry 284, 1031-1039., 2009. [Medline abstract](#)

Molnár A; Tóth A; Bagi Z; Papp Z; Édes I; Vaszily M; Galajda Z; Papp JG; Varró A; Szüts V; Gerő D; Lacza Z; Szabó C: ***Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure***, Molecular Medicine 12(7-8):143-52, 2006. [Medline abstract](#)

Hertelendi Z., Tóth A., Borbély A., Galajda Z., van d., V, Stienen G.J., Édes I. and Papp Z.: ***Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca<sup>2+</sup> sensitivity in human cardiomyocytes.***, Antioxidants and Redox Signaling 10, 1175-1184., 2008. [Medline abstract](#)

Hertelendi Z., Tóth A., Borbély A., Galajda Z., Édes I., Tosaki A. and Papp Z.: ***The peroxynitrite evoked contractile depression can be partially reversed by antioxidants in human cardiomyocytes.***, Journal of Cellular and Molecular Medicine, in press, 2009. [Medline abstract](#)

Édes I.F., Tóth A., Csányi G., Lomnicka M., Chlopicki S., Édes I. and Papp Z.: ***Late-stage alterations in myofibrillar contractile function in a transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy (Tgalphaq\*44).***, Journal of Molecular and Cellular Cardiology 45, 363-372., 2008. [Medline abstract](#)

Kark T., Bagi Z., Lizanecz E., Pásztor E.T., Erdei N., Czikora A., Papp Z., Édes I., Pórszász R. and Tóth A.: ***Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1.***, Molecular Pharmacology 73, 1405-1412., 2008. [Medline abstract](#)

Lizanecz E; Bagi, Z; Pásztor ET; Papp Z; Édes I; Kedei N; Blumberg PM; Tóth A: ***Phosphorylation dependent desensitization of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in CHO-TRPV1 cells by anandamide.***, Molecular Pharmacology 69(3):1015-1023, 2006. [Medline abstract](#)